

巴戟天多糖的分离与纯化新方法

庄江兴^{1,2}, 刘凤娇¹, 叶天助², 杨美花¹, 吴江彬^{*},
陈育琳², 周涵韬¹, 陈清西^{*,*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 漳州市药品检验所, 福建 漳州 363000)

摘要: 以巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 为原料, 运用多种理化方法, 提取纯化巴戟天粗多糖, 经红外吸收光谱比较和鉴定确认提取物中有多糖特征吸收. 采用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 以多糖的纯度和提取率为主要指标, 对提取方法进行优化. 结果表明, 用乙醇-水提取法进行提取, 用 Sevag 法除蛋白, 氯化十六烷基吡啶 (CPC) 结合醇沉法进行纯化. 正交实验结果表明提取纯化巴戟多糖最佳条件是乙醇浓度为 85%, CPC 浓度为 0.4%, 粗多糖浓度为 10% 的条件下, 纯化多糖的纯度为 89.7%, 多糖的提取率为 10.2%.

关键词: 巴戟天; 提取; 分离; 纯化

中图分类号: Q 532.3

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0146-03

巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 又名巴戟、鸡眼藤、黑藤钻、糖藤、三角藤, 为茜草科多年生攀援木质植物, 肉质根入药, 是我国的四大南药之一. 迄今为止, 已从巴戟天属植物中分离和鉴定出的化学成分类型主要有蒽醌、环烯醚萜、低聚糖、多糖等. 药理实验表明, 巴戟天多糖有明显的免疫增强作用^[1], 巴戟天低聚糖还有抗抑郁、补肾阳作用^[2-3]. 目前已开发为药物的巴戟多糖胶囊用于抗抑郁治疗, 已进入三期临床. 因此如何对巴戟多糖进行提取纯化显得十分重要, 本文应用了乙醇-水法回流提取, 并对提取条件进行了优化, 提高了提取率, 然后应用正交实验设计对氯化十六烷基吡啶 (CPC) 结合醇沉法对粗多糖纯化条件进行了优化. 本文应用 CPC 结合醇沉法纯化, 在多糖纯度基本不变的条件下, 其产率比文献报导的硫酸锌法^[4]增加了 15% 左右.

1 材料与方法

1.1 材料

巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 为市售品, 乙醇、氯仿、正丁醇、氯化十六烷基吡啶 (CPC)、氯化钠均为

国产分析纯试剂, 活性碳为药用活性碳.

1.2 方法

1.2.1 巴戟天粗多糖的提取

巴戟天多糖的提取: 取巴戟天干制品, 粉碎, 烘干后, 称取 100 g 加入 10 倍的 75% 乙醇, 沸水浴抽提 2 h 滤过, 用乙酸乙酯萃取, 醇水层旋转蒸干后复溶于适量的蒸馏水中, 采用 Sevag 法除蛋白 (1.2.2), 用活性炭脱色, 旋转蒸干, 得巴戟天粗多糖.

1.2.2 Sevag 法除蛋白

取粗多糖溶液, 加入相当于其体积 1/4 的氯仿-正丁醇 (预先配制成体积比为 4:1 混合液) 溶液 1, 置于具塞试管中, 充分振摇 30 min 后, 经离心机离心 1 min, 然后将水相与氯仿相分开. 将水相再加入相当于其体积 1/4 的氯仿-正丁醇溶液, 重复上述过程, 共计重复 2 次.

1.2.3 正交设计法对粗多糖的纯化条件优化

粗多糖的纯化实验选取反应乙醇浓度、CPC 浓度、糖浓度 3 个因素, 各选 4 个水平, 以得率作为指标, 进行 $L(3^4)$ 正交实验.

1.2.4 氯化钠复溶除去 CPC

将 1.2.3 所得沉淀分别用终浓度为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mol/L 氯化钠溶液复溶, 用无水乙醇加至其终浓度为 85%, 离心收集沉淀即为纯多糖.

1.2.5 红外光谱分析

纯多糖样品于真空干燥 6 h 与 KBr 研磨混合后压片, 扫描分析, 波数范围 400~4 000 cm^{-1} .

收稿日期: 2008-09-10

基金项目: 福建省自然科学基金 (B0510002), 漳州市科技计划项目 (Z07011) 和国家基础科学人才培养基金项目 (J0630649) 资助

* 进修学者:

** 通讯作者: chengqx@xmu.edu.cn

表 1 巴戟天多糖提取正交实验结果

Tab 1 *Morinda officinalis* How polysaccharide by orthogonal experiment

实验号	A (乙醇终浓度)	B(CPC终浓度)	C(糖浓度)	糖含量 /g
1	1(75%)	1(0.5%)	1(2.5%)	0.0053
2	1	2(0.4%)	2(5.0%)	0.0172
3	1	3(0.3%)	3(7.5%)	0.0445
4	1	4(0.2%)	4(10%)	0.0339
5	2(80%)	1	2	0.0245
6	2	2	1	0.0111
7	2	3	4	0.5134
8	2	4	3	0.0610
9	3(85%)	1	3	0.5438
10	3	2	4	1.4742
11	3	3	1	0.0142
12	3	4	2	0.2201
13	4(70%)	1	4	0.0519
14	4	2	3	0.0341
15	4	3	2	0.0293
16	4	4	1	0.0069
K ₁	0.025	0.156	0.009	
K ₂	0.152	0.384	0.073	
K ₃	0.563	0.150	0.171	
K ₄	0.031	0.080	0.518	
R	0.538	0.304	0.509	

1.2.6 多糖含量测定

采用苯酚—硫酸法^[5]测定多糖,精密量取葡萄糖标准液($\rho=200\text{ }\mu\text{g/mL}$) 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL于25 mL具塞比色管中,加蒸馏水至2.0 mL,再加 $\rho=5\%$ 苯酚溶液1.60 mL,摇匀,迅速加入 H_2SO_4 溶液7.5 mL,振摇5 min,放置10 min,置沸水浴中加热20 min,取出冷却至室温于488 nm,以试剂空白为参比测定吸光度.回归方程为 $y=0.0427x+0.0106$ $R=0.999$

2 实验结果

2.1 粗多糖的纯化正交实验结果

粗多糖的纯化实验选取反应乙醇浓度、CPC浓度、糖浓度3个因素,各选4个水平,以得率作为指标,进行 $L(3^4)$ 正交实验.结果如表1.

从表1可知, $R_A>R_B>R_C$,影响多糖提取率的最主要的是乙醇浓度,其次是糖浓度,巴戟天多糖纯化的最优条件是 $A_3B_2C_4$,乙醇浓度为85%,CPC浓度为0.4%,糖浓度为10%的条件下,多糖的提取率为73.7%.

2.2 氯化钠复溶除去 CPC

实验表明随着氯化钠浓度增加,多糖得率也随着增加.当浓度大于0.2 mol/L时多糖得率随着氯化钠浓度的增加而减少.氯化钠浓度在0.2 mol/L时多糖得率最高(见图1).

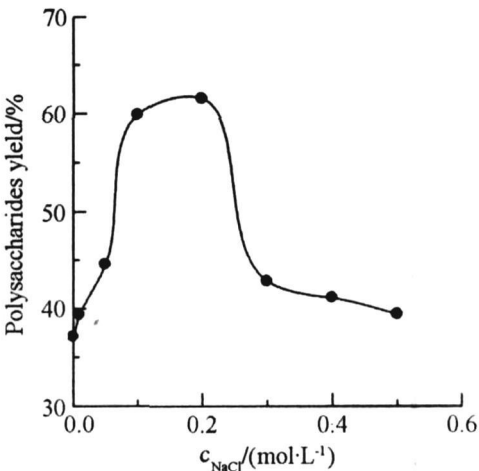


图 1 NaCl浓度对糖得率影响
Fig 1 Effect of NaCl on the yield of polysaccharides by concentration

2.3 红外光谱分析

图2是1.2.3节中粗多糖多纯化后红外扫描分析的结果,可以看出纯化后的巴戟天多糖在波数 $3400\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ 处有强的O-H伸缩振动的特征吸收峰, $3000\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ 处有C-H的特征吸收峰, $1100\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 处有C-O-H和C-O-C伸缩振动吸收峰。

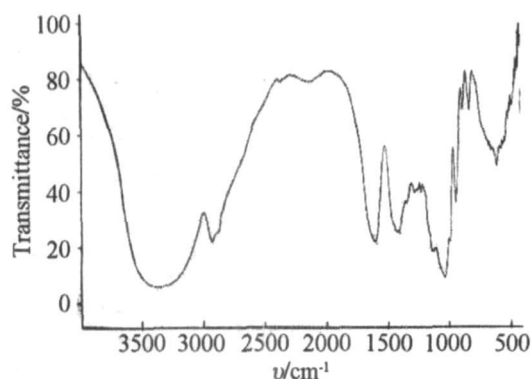


图2 巴戟天多糖红外吸收光谱

Fig 2 The FT-IR spectra of *Morinda officinalis* How polysaccharide

2.4 提纯多糖的含量测定

多糖经上述方法纯化后的纯品用苯酚-硫酸法测定其多糖含量为89.7%,其纯度与文献报道的差不多。然而其提取率为10.2%,文献报道的蒸馏水、1.5%草酸、3.0%草酸、0.15 mol/L NaOH、0.3 mol/L NaOH提取方法提取率为3.85%~4.08%之间,因此用CPC法提取多糖在纯度不变的条件下,其产率增加了15%左右。

3 讨论

多糖由于它们独特的功能和低毒性,在保健食品和药品发展方面具有广阔的应用前景,提取和纯化是制备多糖的关键。目前用的提取方法有:常规水提法、超声波、微波辅助提取、超临界流体萃取;分离纯化技术有:色谱、膜分离^[6]。

药理实验表明,巴戟天多糖有明显的免疫增强作用,巴戟天低聚糖还有抗抑郁、补肾阳作用。然而巴戟天多糖的提取和纯化尚少见报道,且文献报导方法均为实验室少量提取制备,以供理化性质及药理研究之用,不宜用于工业化大量生产巴戟多糖。本文首次应用CPC法对巴戟天多糖提取及纯化新方法,并对此方法进行了条件优化。结果表明该法简便、快速,所得多糖纯度高,提取效率高,可望用于工业化大生产。

参考文献:

- [1] 王卫平. 巴戟天化学成分和药理作用研究概况[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(7): 665-666
- [2] 崔承彬, 杨明, 姚志伟, 等. 中药巴戟天中抗抑郁活性成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(1): 36-39
- [3] 陈江弢, 杨崇仁. 当归属植物的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(4): 359-365
- [4] 陈忠, 刘琳玲, 何猛雄, 等. 南药巴戟天多糖提取方法的比较研究[J]. 科技通报, 2004, 20(6): 546-548
- [5] 陈红红, 黄丽玫, 德庆等地巴戟天中蒽醌及多糖含量测定[J]. 广州药学院学报, 2002, 18(2): 103-105
- [6] 陈忠, 刘琳玲, 何猛雄, 等. 多糖提取与纯化技术应用进展[J]. 食品研究应用与开发, 2007, 28(3): 186-188

Study of Methods for Extraction and Purification Polysaccharide from *Morinda officinalis* How

ZHUANG Jiang-xing^{1,2}, LU Feng-jiao¹, YE Tian-zhu², YANG Mei-hua¹,
WU Jiang-bin^{*}, CHEN Yu-lin^{1,2}, ZHOU Han-tao¹, CHEN Qing-xi^{1,2*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Zhangzhou Institute for Drug Control, Zhangzhou 363000, China)

Abstract Polysaccharides from *Morinda officinalis* were extracted by several kinds of physical and chemical methods and were identified by IR. The amount of polysaccharide was measured by using the sulfuric acid-phenyl hydroxide method of spectrophotometry at 490 nm. By analyzing their polysaccharide, these methods were optimized in terms of their respective yield of extraction and purification rate. The result of the experiment showed that ethanol-water treatment is proved to be a good method for extracting polysaccharide from *Morinda officinalis*. The optimal conditions for preparation operation were 85% alcohol, 0.4% Cetylpyridinium Chloride and 10% polysaccharide concentration in the solution. The yield of polysaccharides was 10.2 g per 100 g of *Morinda officinalis*.

Key words *Morinda officinalis* How; extraction; separation; purification